

اثر تنش خشکی ناشی از PEG در چند گونه یونجه یکساله در شرایط آب کشت (Aquaculture)

عباس قمری زارع^۱، سعید رضوانی^۲ و مسح فروتن^۳

^۱- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار گروه تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور پست الکترونیک: ghamari-zare@fifr-oc.ir

^۲- کارشناس ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت، کرمان.

^۳- مرتبی پژوهشی، گروه تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۷/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱/۲۹

چکیده

یونجه های یکساله (*Medicago spp.*) گیاهانی مناسب برای کشت در مناطقی هستند که دچار مشکل فرسایش خاک هستند و از آنجا که این مناطق با محدودیت منابع آبی مواجهند، مقاوم بودن این گونه ها در برابر تنش خشکی نقش مهمی در استقرار آنها ایفا می کند. در این تحقیق، واکنش به تنش آبی ^۱ جمعیت از پنج گونه یونجه یکساله در شرایط آب کشت (aquaculture) ارزیابی شد. برای القای تنش خشکی از غاظت های مختلف PEG استفاده شد و برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از قبیل درصد جوانه زنی، وضع ظاهری برگ ها، طول ریشه و ساقه و میزان پرولین آزاد و قندهای محلول علوفه اندازه گیری شد. نتایج حاکی از این است که تیمار PEG نقش مهمی در القای تنش خشکی داشت. پارامترهای بیوشیمیایی در مقایسه با پارامترهای فتوتیبی همبستگی بیشتری با تنش خشکی نشان دادند. به نظر می رسد که ذخیره قند در سیتوپلاسم از سطوح پایین تنش آغاز می شود و با افزایش تنش، گیاه اقدام به ذخیره پرولین می نماید. برتری جمعیت ها از نظر صفات یاد شده الگوی یکنواختی نداشت به طوری که *M. truncatula* از نظر صفات بیوشیمیایی و *M. orbicularis* از نظر صفات فتوتیبی نسبت به گونه های دیگر برتری نشان دادند. احتمال دارد بهبود مقاومت به خشکی از طریق ذخیره پرولین در حین پدیده اشتقاق فیلوژنتیک در ژنوم یونجه پدید آمده باشد.

واژه های کلیدی: یونجه یکساله، آب کشت، تنش خشکی، پلی اتیلن گلیکول

مقدمه

حدود ۱۴ گونه آن در ایران گزارش شده است (سندگل و ملک پور، ۱۳۷۳). دامنه پراکنش این گونه ها، مناطق خزری در شمال ایران، مناطق مدیترانه ای فلات مرکزی و غرب ایران و نواحی ساحلی خلیج فارس و دریای عمان در جنوب و جنوب غرب را در بر می گیرد. مهم ترین ویژگی این جنس، توانایی تثبیت نیتروژن در زمین است که علاوه

گونه های یکساله یونجه (*Medicago spp.*) در دهه های اخیر به دلیل ویژگی های خاص آن در زراعت های دیم و مرتعداری مورد توجه واقع شده است. جنس *Medicago* ۳۴ گونه یکساله دارد که طبق بررسی های انجام شده طی دهه های ۶۰ و ۷۰ خورشیدی،

در روش‌های متعارف بررسی مقاومت به خشکی، گیاهان آزمایشی در شرایط مزروعاتی با استفاده از کنترل دوره و میزان آبیاری مورد مطالعه قرار می‌گیرند (به عنوان نمونه Clifford و همکاران، ۱۹۹۸، Specht و همکاران، ۲۰۰۱). در چنین شرایطی عوامل دیگری نظیر شرایط اقلیمی و پدیده‌های جوی (بارش یا خشکسالی‌های غیر متربقه) می‌تواند بر داده‌ها تأثیر گذارد و محقق ناگزیر از تکرار آزمون‌ها در زمان و مکان‌های مختلف خواهد بود. استفاده از شرایط محیطی کنترل شده این امکان را فراهم می‌آورد که عوامل دارای اثرات ناخواسته را حذف و منابع تغییر را به عوامل تحت کنترل محدود کرد. از سوی دیگر، مطالعه گیاه در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی مستلزم یافتن راهی برای شبیه‌سازی شرایط طبیعی است، به طوری که مثلاً اعمال تنفس در شرایط آزمایشگاهی، تا حد امکان ساز و کاری مشابه تنفس‌های طبیعی داشته باشد. پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) با وجود محلول بودن در آب و میل ترکیبی کم با محیط، به دلیل بزرگی ملکول آن و توانایی ایجاد فشار اسمزی منفی، روش مناسبی برای القای مصنوعی و یکنواخت خشکی در شرایط آزمایشگاهی است و لذا در مطالعات متعددی به عنوان عامل ایجاد تنفس خشکی استفاده شده است (برای نمونه Rodriguez و همکاران، ۲۰۰۴، Turkan و همکاران، ۲۰۰۵، Vajrabhaya و همکاران، ۲۰۰۱، Zhu و همکاران، ۲۰۰۶).

در ایران مطالعات محدودی در زمینه اثرات کم آبی بر یونجه‌های یکساله انجام شده (پهلوان‌پور فردجمهری، ۱۳۷۶) که عمدتاً ارزیابی گیاه در برابر تنفس بر پایه صفات فنوتیپی و در گلخانه یا مزرعه انجام پذیرفته است. تحقیق حاضر به بررسی اثرات تنفس خشکی بر صفات فنوتیپی و بیوشیمیابی در چند گونه از یونجه‌های یکساله پرداخته

بر نقش مهمی که در تناوب‌های زراعی دارد، می‌تواند در برنامه‌های استقرار درختان و بوته‌ها نیز مفید باشد. بر همین اساس ترویج زراعت یونجه یکساله در ایران، خواه به صورت کشت در آیش‌های دیمکاری و خواه به صورت کشت بین ردیف‌های درختان مورد توجه است. در اقلیم‌های گرم، کشت یونجه یکساله به عنوان جایگزین آیش تابستانه برای حفاظت خاک در برابر فرسایش، جلوگیری از گسترش علف‌های هرز و افزایش حاصلخیزی خاک توصیه شده است Badaruddin & Rumbaugh & Johnson, 1986). Meyer, 1990 کشت یونجه یکساله شامل مطالعات سازگاری گونه‌ها در مناطق مختلف از نظر میزان تولید علوفه خشک (اکبرزاده و سالاری، ۱۳۶۸)، سازگاری با کشت‌های مخلوط (حیدری شریف آباد، ۱۳۶۷)، برخی ویژگیهای به‌زراعی (خلیلی، ۱۳۷۰، باقری، ۱۳۸۰)، ویژگیهای ژنتیکی (میرزاپی ندوشن، ۱۳۷۹ و شریعت و همکاران، ۱۳۸۰a و ۱۳۸۰b) و همچنین تأثیر باکتری‌های همزیست یونجه یکساله (حیدری شریف آباد و ایران‌منش، ۱۳۷۵، دشتی، ۱۳۷۵) در اقلیم‌های مختلف ایران انجام شده است.

با توجه به اینکه کشت گونه‌های یکساله یونجه در مراعع یا دیمزارها صورت می‌گیرد، محدودیت منابع آبی از مواردی است که تأثیر بسزایی بر عملکرد آنها می‌گذارد. با وجودی که بر پایه برخی گزارش‌ها، یونجه یکساله در مناطق با بارندگی کمتر از ۲۵۰ میلیمتر در سال نیز کشت شده (Brahim & Smith, 1993)، در ایران کشت یونجه یکساله در مناطقی توصیه شده که حداقل ۲۰۰ میلیمتر در سال بارندگی داشته باشند.

(۶۰۰۰)، تیمار فشار اسمزی ۶-بار (مرطوب شدن با محلول هوگلنند بعلاوه ۱۸۹g/1 پلی اتیلن گلیکول، ۶۰۰۰)، تیمار فشار اسمزی ۹-بار (مرطوب شدن با محلول هوگلنند بعلاوه ۲۲۲g/1 پلی اتیلن گلیکول، ۶۰۰۰)، تیمار فشار اسمزی ۱۲-بار (مرطوب شدن با محلول هوگلنند بعلاوه ۲۵۱g/1 پلی اتیلن گلیکول، ۶۰۰۰). رابطه بین غلاظت PEG6000 و فشار اسمزی بر اساس یافته های Fisher (۱۹۸۵) ذکر شده است. سرعت جوانهزنی به صورت نسبت تعداد بذور جوانه زده در هر روز به شماره همان روز محاسبه شد.

گیاهچه های تا مرحله دو برگی (۱۱ روز پس از کشت) در گلدان های پلاستیکی محتوى شن کوارتز شسته و استریل شده (در دمای ۸۰°C به مدت ۲۴ ساعت) در اتاق رشد (دما ۲۰°C، روشنایی ۱۲ ساعت در شبانه روز) تولید شدند. طی این مدت آبیاری روزی دو بار با محلول هوگلنند (جدول ۱) انجام شد. گیاهچه های دو برگی در لوله های اپندورفی که درپوش و انتهای آن قیچی شده بود به وسیله پنبه تثبیت شده و به مدت ۳۹ روز در تانک های آب کشت حاوی محلول هوگلنند استقرار یافتند. سپس تیمارهای خشکی در قالب طرح آزمایشی مورد نظر با دو فاکتور (۵ سطح تنفس و ۹ جمعیت از گونه های یونجه یکساله) با محلول هوگلنند همراه با سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول اعمال شدند.

در دو نوبت (۲۲ روز و ۲۶ روز بعد از اعمال تنفس) وضع ظاهری برگ ها و قسمت هوایی بررسی و بر اساس جدول ۲ به هر نشاء نمره داده شد. در فاصله ۳۷ تا ۳۹ روز بعد از اعمال تنفس، نمونه ها از اپندورف خارج شده و طول ریشه و ارتفاع ساقه در آنها اندازه گیری شد. استحصال عصاره گیاهی، اندازه گیری پرولین آزاد و تعیین

است. از آنجا که در مطالعات مزرعه ای و صحرایی، عوامل محیطی خارج از کنترل بر جمع آوری داده ها اثر گذاشته و خطای آزمایشی را بالا می برد، در این تحقیق برای یکسان نگهداشتمن اثر عوامل محیطی، مواد آزمایشی از محیط کنترل شده آب کشت (aquaculture) برای نگهداری مواد آزمایشی استفاده شد.

مواد و روشها

ماده آزمایشی مورد استفاده، ۹ جمعیت از پنج گونه یکساله جنس *Medicago* به این شرح بود: ۱ و ۲) جمع آوری شده از اهواز و گرگان. ۳ و ۴) جمع آوری شده از گیلان غرب و گرگان. ۵ و ۶) جمع آوری شده از کردستان و گرگان. ۷ و ۸) جمع آوری شده از ارومیه و اسلام آباد غرب. ۹) از سانتیاگو، شیلی. بذرها ابتدا با آسیاب بر قی از غلاف جدا شده و سطح خارجی آنها جهت رفع سختی پوسته بذر و تسهیل در جوانهزنی با کاغذ سنباده خراش داده شد. سپس بذرها ابتدا به مدت ۱۰ ثانیه در الکل ۹۰٪ و پس از آن ۳ دقیقه در محلول ۲٪ کلرید جیوه ضد عفونی شده و ۵ الی ۶ بار با آب مقطر شستشو داده شدند.

بذرها پس از شستشو در آب مقطر، درون پتی دیش های استریل شده که کف آن با کاغذ صافی استریل پوشانده شده بود قرار گرفتند. آزمایش بر اساس یک طرح کرت های خرد شده (۵ سطح تنفس در کرت اصلی و جمعیت ها در کرت فرعی) با سه تکرار بود. سطوح تنفس به شرح زیر بود: تیمار شاهد (مرطوب شدن با محلول هوگلنند)، تیمار فشار اسمزی ۳-بار (مرطوب شدن با محلول هوگلنند بعلاوه ۱۳۸g/1 پلی اتیلن گلیکول

تفاوت معنی داری ($P < 0.001$) بین سطوح مختلف تنش خشکی را نشان داد به طوری که با افزایش فشار اسمزی، میانگین درصد جوانه زنی نیز کاهش یافت (شکل ۳).

تجزیه به مؤلفه های اصلی برای صفات اندازه گیری شده، حاکی از تنوع واکنش جمعیت های مورد مطالعه به شرایط تنش بود، به طوری که به استثنای گونه های *M. polymorpha* و *M. orbicularis* بقیه گونه ها در گروه های یکسان قرار نگرفتند (شکل ۴). مؤلفه های اصلی اول تا سوم به ترتیب ۴۳٪، ۳۰٪ و ۱۴٪ (در مجموع ۸۷٪) تغییرات مشاهده شده را توجیه کردند (جدول ۳). تأثیر پذیری مؤلفه های اصلی از صفات ارزیابی شده کاملاً متنوع بود به طوری که در مؤلفه اول بیشترین ضریب تغییرات مثبت متعلق به قندهای محلول و پرولین آزاد (به ترتیب ۰/۴۰ و ۰/۳۹) بود. در مؤلفه دوم نمره سلامت گیاه در نوبت دوم و پس از آن نمره سلامت گیاه در نوبت اول بزرگترین ضریبها را داشتند و برای مؤلفه اصلی سوم پرولین آزاد و ارتفاع ساقه حائز بزرگترین ضرایب بودند. در مجموع، صفات مورد بررسی همبستگی معنی داری با هم نشان ندادند (به طوری که بالاترین ضریب همبستگی (بین طول ریشه و میزان قندهای محلول) برابر ۰/۷۴ بود (جدول ۵).

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس جداگانه هر صفت، گونه *M. polymorpha* دارای بیشترین طول ساقه، گونه های *M. orbicularis* مورد مطالعه دارای بیشترین طول ریشه، گونه *M. truncatula* اهواز دارای بالاترین میزان پرولین آزاد و گونه *M. truncatula* گرگان دارای بیشترین قند محلول بودند (جدول ۴). نمودارهای تغییرات شدت بروز صفات اندازه گیری شده در جمعیت های مورد مطالعه، حاکی از افزایش تقریباً

قندهای محلول بر اساس روش Irigoyen و همکاران (۱۹۹۲) با احتساب تغییرات اعمال شده توسط عبادی خزینه قدیم (۱۳۷۸) انجام پذیرفت.

داده های خام حاصل توسط Excel ذخیره شدند و نمودارها به کمک همین نرم افزار تهیه شد. محاسبات تجزیه واریانس (ANOVA) و تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCA) به کمک نرم افزار SAS انجام شد. داده های به دست آمده از آزمایش جوانه زنی بذور پس از تصحیح به کمک روش ANOVA در قالب طرح کرت های خرد شده تحلیل شد. تجزیه به مؤلفه های اصلی بر اساس روش Sheidai و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده های مربوط به درصد جوانه زنی تفاوت معنی داری ($P < 0.01$) بین جمعیت های نشان داد. جمعیت های مورد مطالعه گونه *M. rigidula* (به ترتیب ۶۵٪ و ۵۶٪ برای کردستان و گرگان) و پس از آن دو جمعیت از *M. truncatula* (به ترتیب ۵۶٪ و ۴۷٪ برای گرگان و اهواز) نسبت به سایر گونه ها جوانه زنی بالاتری داشتند (شکل ۱). مقایسه درصد جوانه زنی در داخل تیمارهای تنش خشکی نیز مؤید بالاتر بودن درصد جوانه زنی جمعیت های *M. rigidula* کردستان بود (شکل ۲). از سوی دیگر، جمعیت های *M. radiata* ارومیه و *M. polymorpha* نیز پایین ترین میانگین درصد جوانه زنی را نشان دادند. با افزایش شدت تنش، افت درصد جوانه زنی در گونه *M. rigidula* کردستان کمترین مقدار بود و پس از آن گونه های *M. truncatula* و *M. orbicularis* از گیلان غرب کمترین مقدار افت تنش را داشتند (شکل ۲). همچنین میانگین درصد جوانه زنی

به مؤلفه‌های اصلی، مقایسه نمودار تغییرات صفات گروه اول و دوم بر حسب سطح تنش نشان می‌دهد در حالی که صفات گروه دوم همبستگی بالایی با سطح تنش دارند، تغییرات صفات گروه اول تا حدی نوسان‌دار و نامنظم است. این مشاهده‌ها، این فرض را تقویت می‌کند که ارتفاع ساقه و طول ریشه در تحقیق حاضر، علاوه بر تنش خشکی از عوامل دیگری نیز تأثیر پذیرفته‌اند. به عنوان مثال میزان نور و میزان ازت از جمله عواملی هستند که می‌توانند بر ارتفاع ساقه تأثیر بگذارند (خلیلی، ۱۳۷۰). همچنین عواملی نظیر سهولت دسترسی به آب و دما بر طول ریشه تأثیر می‌گذارد (Lyons و همکاران، ۲۰۰۷، Malcolm و همکاران، ۲۰۰۴). از سوی دیگر، صفات دسته دوم (پرولین و قندهای محلول) به طور اختصاصی از تنش خشکی (و نیز شوری) تأثیر گرفته و شرایط محیطی کمتر بر آن اثر گذاشته است. پرولین به دلیل حلالیت بالا در آب، در شرایطی که سلول با کم آبی مواجه می‌شود با غلظت بالای خود باعث کاهش پتانسیل اسمزی شده (Aspinal & Paleg, 1980) و نیز به عنوان محافظ غشای سلولی در برابر غلظت بالای یون سدیم عمل می‌کند (Vajrabhaya و همکاران، ۲۰۰۱). از سوی دیگر برخی ترکیبات قندی با تجمع در سیتوپلاسم سلول باعث افزایش فشار اسمزی و ذخیره یون سدیم در واکوئل‌ها می‌شود (Bohnert و همکاران، ۱۹۹۵). همچنین تجمع قندها در واکوئل باعث جلوگیری از نوسان پتانسیل اسمزی در سلول می‌شود (Thomas, 1997). لذا تغییرات مقدار این مواد در سلول به عنوان یک شاخص واکنش گیاه نسبت به شرایط تنش تلقی می‌شود.

بررسی ضریب همبستگی بین صفات مختلف در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، حاکی از پایین بودن همبستگی

یکنواخت میزان پرولین آزاد با شدت تنش بود. این تغییرات در مورد سایر صفات یکنواختی کمتری داشت هرچند روند تغییرات با افزایش شدت تنش برای صفات ارتفاع ساقه و طول ریشه، کاهش و برای قندهای محلول، افزایش نشان داد (شکل ۵).

در مقایسه سطوح مختلف تنش (پلی اتیلن گلیکول)، تفاوت بین سطوح کاملاً معنی دار بود به طوری که میانگین سطوح تنش برای همه صفات در سطح ۱٪ معنی دار بود و آزمون دانکن هر سطح تنش را در یک گروه قرار داد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز نشان داد که مؤلفه اول به تنهایی ۹۱٪ تغییرات را توجیه می‌کند و سهم سطوح مختلف تنش در مؤلفه اصلی اول با افزایش سطح تنش (غاظت پلی اتیلن گلیکول) کاهش می‌یابد.

بحث

صفت‌هایی که برای ارزیابی جمعیت‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفتند را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد: دسته اول (طول ریشه و ارتفاع ساقه) صفاتی فنتوپیکی هستند که به صورت کمی بیان می‌شوند. دسته دوم (میزان پرولین آزاد و قندهای محلول) صفاتی هستند که با روش‌های شیمیایی اندازه‌گیری شده‌اند. دسته سوم (وضع ظاهری برگ‌ها در حین تنش، در دو مرحله از رشد) در عین فنتوپیکی بودن به صورت مشاهده‌ای (نموده‌دهی) بیان شده‌اند.

الگوی بروز این صفات، به خصوص صفات گروه‌های اول و دوم، در سطوح مخالف تنش و نیز جمعیت‌های مورد مطالعه تفاوت‌های قابل توجهی دارد. علاوه بر بیشتر بودن سهم صفات گروه دوم (پرولین و قندهای محلول) نسبت به گروه اول (ارتفاع ساقه و طول ریشه) در تجزیه

گیاه در ابتدا شروع به ذخیره قند و سپس با شدیدتر شدن تنش اقدام به ذخیره پرولین در غشای سلولی کرده است. به بیان دیگر، تجمع پرولین در غشای سلولی یک سازوکار اضطراری برای تحمل خشکی به شمار می‌رود. نظری این Culter سازوکار در بروز مقاومت به خشکی در پنه (& Rains, 1978) و همچنین مقاومت به شوری در صنوبر نیز مشاهده شده است (Ottow و همکاران, ۲۰۰۵). در عین حال باید توجه داشت که در تحقیق حاضر جمعیت‌های محدودی مورد بررسی قرار گرفته و پدیده مذبور تنها در برخی از آنها مشاهده شده است، بنابراین برای تأیید یک نتیجه کلی باید گستره وسیع‌تری از جمعیت‌ها و در صورت لزوم با تکرارهای بیشتر بررسی شود. همچنین باید توجه داشت که علیرغم رایج بودن استفاده از PEG در مطالعات مربوط به تنش خشکی، بررسی جمعیت‌ها در شرایط مزرعه‌ای و با اعمال تیمارهایی مشابه شرایط طبیعی در زمان‌ها و مکان‌های مختلف برای نتیجه‌گیری‌های نهایی لازم است؛ ضمن اینکه توجه به این نکته لازم است که واکنش گیاه در شرایط طبیعی تنها از سازوکارهای سلولی تأثیر نمی‌گیرد و عوامل ناشناخته یا خارج از کنترل نیز بر آن مؤثر است.

بررسی نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی حاکی از این است که در گونه‌هایی که از دو منطقه جمع آوری شده، سهم مؤلفه اصلی اول برای افراد یک گونه ولی از دو منطقه تقریباً یکسان است. از آنجا که مؤلفه اصلی اول بیشتر از میزان قندهای محلول و پرولین آزاد تأثیر پذیرفته و نمونه‌ها نیز تحت شرایط کنترل شده رشد کرده‌اند، ناچیز بودن تفاوت اثر زیستگاه دور از ذهن نمی‌نماید. این تفاوت تنها در دو گونه *M. radiata* بررسی شده چشمگیر است که دلیل آن روشن نیست. نکته دیگری که در

بین صفات و استقلال آنها از هم است. بیشترین ضریب همبستگی بین طول ریشه و میزان قند محلول و نیز بین طول ریشه و میزان پرولین آزاد مشاهده می‌شود. Noland و همکاران (۱۹۹۷) همبستگی منفی مشابهی را بین طول ریشه و میزان هیدروکربن آن گزارش کرده‌اند. آنها معتقدند که ریشه در شرایط تنش شروع به مصرف ذخایر هیدروکربن خود می‌کند. Sanchez و همکاران (۲۰۰۵) نیز یافته مشابهی را برای ارتباط میزان پرولین و طول ریشه گزارش کرده‌اند. با وجودی که احتمال دارد در تحقیق حاضر این سازوکار، علت بالاتر بودن همبستگی بین طول ریشه و میزان قند محلول و پرولین آزاد نسبت به سایر صفت‌ها باشد، باید توجه داشت که برای اثبات چنین رابطه‌ای، باید میزان پرولین آزاد و قندهای محلول تنها در بافت ریشه (و نه در کل گیاه) ملاک بررسی باشد. از آنجا که در تحقیق حاضر میزان پرولین آزاد و قندهای محلول در کل گیاه اندازه‌گیری شده، خطاهای احتمالی مؤثر بر میزان پرولین آزاد و قندهای محلول در ساقه و برگ، بررسی وجود یک رابطه دقیق بین طول ریشه و میزان پرولین آزاد و قندهای محلول را ناممکن می‌کند.

مورد قابل توجه دیگر در این پژوهش، تفاوت در الگوی تغییر میزان قندهای محلول و پرولین آزاد است. با افزایش تنش، پرولین آزاد در تمام جمعیت‌های مورد مطالعه افزایشی تدریجی داشته و تنها برخی جمعیت‌ها در سطوح بالای تنش افزایشی ناگهانی را نشان دادند. این در حالی است که میزان قندهای محلول بیشتر جمعیت‌های مورد بررسی، علیرغم تقریباً یکسان بودن در شرایط بدون تنش (شاهد)، حتی در سطوح پایین تنش هم تفاوت چشمگیری را بین جمعیت‌ها نشان دادند. بر این اساس چنین به نظر می‌آید که با افزایش تدریجی تنش، سلول

بالاترین میزان قندهای محلول و پرولین آزاد را در شرایط تنش در خود ذخیره کرده، و این احتمال را تقویت می‌کند که بهبود سازوکار مقاومت به خشکی، طی فرایند اشتراق ژنتیکی کسب شده باشد. به همین ترتیب و با توجه به درصد جوانه‌زنی گونه‌های بررسی شده، به نظر می‌رسد که *M. rigidula* اشتراق ژنتیکی بر بهبود جوانه‌زنی گونه‌های *M. rigidula* و *M. truncatula* نسبت به سه گونه دیگر نیز تأثیر گذاشته باشد. شایان ذکر است که نتایج موجود تنها احتمال وجود ارتباط بین مقاومت به خشکی و تکامل فیلوزنیکی را تقویت می‌کند و برای اثبات وجود چنین سازوکارهایی بررسی‌های ژنتیک ملکولی ضروری است.

پهلوان‌پور (۱۳۷۶) در مطالعه خود بر روی تعدادی از گونه‌های *Medicago*، (از جمله گونه‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر) به بررسی اثر تنش خشکی بر پارامترهای رشد پرداخته است. اگرچه در نگاه اول به نظر می‌رسد نتایج ارزیابی‌های تحقیق یاد شده در مورد مقاومت *M. truncatula* تفاوت چشمگیری با تحقیق حاضر دارد، توجه به این نکته ضروری است که در آن تحقیق، پارامترهای بیوشیمیایی (پرولین و قندهای محلول) در ارزیابی‌ها لحاظ نشده و نتیجه‌گیری تنها بر اساس مؤلفه‌های رشد صورت گرفته بود. این در حالی است که در مواردی که در هر دو تحقیق مؤلفه‌های مشابهی برای ارزیابی استفاده شده بود، نتایج تا حدودی با هم همخوانی داشتند (مانند درصد بالای جوانه‌زنی گونه *M. rigidula* در شرایط تنش). در عین حال در مقایسه نتایج این دو تحقیق باید به تفاوت‌های شرایط محیطی و ابزارهای آزمایش هم توجه داشت.

دانستن نوع واکنش گیاه به خشکی، می‌تواند در تصمیم‌گیری برای انتخاب گونه مناسب و به تبع آن بهبود

واکنش جمعیت‌های مورد مطالعه به تنش خشکی قابل تأمل است، تنوع این واکنش‌ها است که ضرایب همبستگی پایین بین صفات در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز این امر را تأیید می‌کند. به عنوان نمونه، مشاهده می‌شود گونه *M. truncatula* در مقایسه با گونه *M. orbicularis* شرایط تنش ریشه و ساقه بلندتری تولید کرده اما ذخیره قندهای محلول و پرولین آزاد آن کمتر است. مقایسه کلی نتیجه آزمون‌های تجزیه واریانس آزمون رشد در شرایط تنش و آزمون درصد جوانه‌زنی نشان می‌دهد که دو گونه *M. rigidula* و *M. truncatula* در سطح سلولی مقاومت بهتری در برابر خشکی نشان داده‌اند و این در حالی است که گونه‌های *M. polymorpha* و *M. orbicularis* ضمن پایین بودن مقاومت سلولی به خشکی، ماده خشک بیشتری در شرایط تنش تولید کرده‌اند. همچنین در بین گونه‌های مطالعه شده، *M. radiata* کمترین مقاومت به خشکی را نشان داده است. از آنجا که تنش اعمال شده تحت شرایط کنترل شده بوده، تفاوت مشاهده شده در بین گونه‌ها را نمی‌توان چندان متأثر از زیستگاه طبیعی دانست و تنوع ژنومی نقش مهم‌تری در آن ایفا می‌کند. Bena (۲۰۰۱) با مقایسه بخشی از توالی ژنتیکی ۵۷ گونه جنس *Medicago*، ارتباط فیلوزنیک آنها را ترسیم کرده که ارتباط گونه‌های مورد مطالعه به شرح دندروگرام شکل ۶ می‌باشد. طبق این نمودار، ساختار ژنتیکی گونه *M. radiata* نسبت به سایر گونه‌ها مدت طولانی‌تری بدون تغییر مانده و گونه‌های *M. orbicularis* و *M. polymorpha* در رده‌های بعدی اشتراق ژنتیکی متعلق به دو گونه *M. radiata* و *M. rigidula* و *M. truncatula* است. گونه *M. truncatula* در مقایسه با سایر گونه‌های مورد مطالعه،

سطح سلولی تنش خشکی را بهتر تحمل کنند به دلیل توانایی بیشتر در استقرار، گونه‌های مناسب‌تری خواهند بود. البته باید توجه داشت که در انتخاب چنین رویکردهای سایر مؤلفه‌های سازگاری گونه با محیط نیز باید مد نظر قرار گیرد؛ و چنانچه بنا باشد از راهکار به کار گرفته شده در تحقیق حاضر برای انتخاب گونه مناسب استفاده شود، این راهکار باید در قالب برنامه‌ای اجرا شود که سایر مؤلفه‌های سازگاری (مانند شرایط اقلیمی، خاک، آفت‌ها و بیماری‌ها) نیز در آن لحاظ شده باشند.

کاربری زمین مؤثر باشد. از آنجا که یونجه می‌تواند به دو منظور (تولید علوفه و حفاظت خاک) کشت شود، توجه به واکنش آن در برابر خشکی می‌تواند هدف کشت را به نحو مطلوب‌تری تأمین کند. چنانچه زمین زیر کشت یونجه برای چرای دام استفاده شود، گونه‌هایی که در شرایط تنفس ماده خشک بیشتر داشته باشند برای کشت مناسب‌تر خواهند بود. اما از سوی دیگر اگر هدف اصلی کشت یونجه، جلوگیری از فرسایش خاک باشد، گونه‌هایی که در شرایط تنفس جوانه‌زنی بیشتری داشته باشند یا در

جدول ۱: محلول هوگلنند به کار رفته برای آبیاری نمونه‌های مورد استفاده برای آزمون تنفس خشکی و جوانه‌زنی (از Hoagland و همکاران، ۱۹۵۰ با تغییرات)

| ماده شیمیایی | مقدار (mg/l) |
|--|--------------|
| MgSO ₄ .7H ₂ O | ۲۴/۶۳ |
| KH ₂ PO ₄ | ۱/۷ |
| Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O | ۰/۶ |
| CuSO ₄ .2H ₂ O | ۰/۴ |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | ۰/۱۱ |
| MnCl ₂ .2H ₂ O | ۰/۹ |
| H ₃ BO ₃ | ۱/۴۳ |
| EDTA | ۳ |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | ۲۴/۴۹ |
| K ₂ SO ₄ | ۲۱/۷۷ |
| CaCO ₃ .2H ₂ O | ۴۳ |

جدول ۲: مقیاس نمره‌دهی به وضع ظاهری جمعیت‌های یونجه تحت آزمایش تنفس خشکی در ۷۲ روز و ۷۶ روز بعد از کشت (عدد کوچکتر نشانه بروز شدیدتر صفت است).

| نمره | توصیف ظاهری |
|------------|---|
| ۳، ۲، ۱ | پژمردگی کامل |
| ۶، ۵، ۴ | برگ‌ها دچار پیچیدگی شده و دمبرگ‌ها پژمرده شده‌اند |
| ۹، ۸، ۷ | برگ‌ها دچار پیچیدگی شده ولی دمبرگ‌ها هنوز شادابند |
| ۱۲، ۱۱، ۱۰ | برگ‌ها شروع به پیچیدن کرده |
| ۱۵، ۱۴، ۱۳ | بدون تنفس |

جدول ۳: مقادیر ویژه مؤلفه‌های اصلی اول تا سوم و سهم صفات اندازه‌گیری شده در هریک از مؤلفه‌ها در مقایسه جمیعت‌های یونجه یکساله در تنش خشکی

| مؤلفه سوم | مؤلفه دوم | مؤلفه اول | |
|-----------|-----------|-----------|--------------|
| ۰/۸۱ | ۱/۸۲ | ۲/۶۰ | مقدار ویژه |
| ۰/۱۴ | ۰/۳۰ | ۰/۴۳ | مقدار نسبی |
| ۰/۸۷ | ۰/۷۴ | ۰/۴۳ | مقدار تجمعی |
| ۰/۲۲ | ۰/۵۱ | ۰/۳۴ | سلامت گیاه ۱ |
| ۰/۰۲ | ۰/۶۳ | ۰/۱۷ | سلامت گیاه ۲ |
| ۰/۴۲ | -۰/۲۶ | -۰/۴۶ | ارتفاع ساقه |
| -۰/۰۲ | ۰/۲۶ | -۰/۵۷ | طول ریشه |
| ۰/۷۴ | -۰/۲۶ | ۰/۳۹ | پرولین آزاد |
| -۰/۴۸ | -۰/۳۸ | ۰/۴۰ | قندهای محلول |

جدول ۴: میانگین بروز صفت‌های اندازه‌گیری شده در جمیعت‌های مورد مطالعه یونجه یکساله، به همراه دسته‌بندی بر اساس آزمون دانکن. (کمیت‌های مشخص شده با حروف یکسان فاقد تفاوت معنی دار آماری هستند).

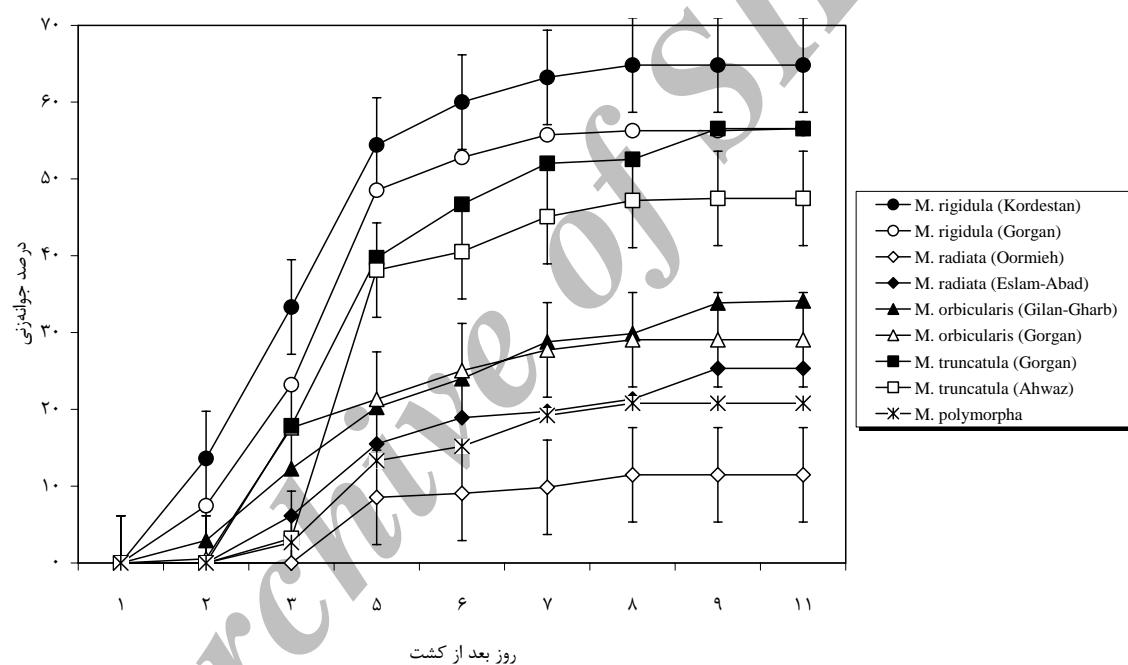
| جمیعت | ارتفاع ساقه (cm) | ارتفاع ساقه (cm) | طول ریشه (cm) | پرولین آزاد ^۱ (μmol/g) | قندهای محلول ^۱ (mg/g) |
|-------------------------------------|------------------|------------------|---------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| <i>M. orbicularis</i> (Gorgan) | A | ۱۰/۸۰ | A | ۲۸/۸۰ | G |
| <i>M. orbicularis</i> (Gilan-Gharb) | A | ۱۰/۶۰ | A | ۲۷/۲۲ | F |
| <i>M. polymorpha</i> | A | ۱۱/۶۵ | B | ۲۴/۲۶ | G |
| <i>M. radiata</i> (Eslam-Abad) | D | ۵/۳۱ | C | ۲۱/۲۰ | D |
| <i>M. radiata</i> (Oormieh) | D | ۵/۳۸ | C | ۱۸/۹۹ | E |
| <i>M. rigidula</i> (Gorgan) | B | ۹/۲۷ | B | ۲۳/۷۰ | C |
| <i>M. rigidula</i> (Kordestan) | B | ۸/۷۸ | B | ۲۲/۹۸ | I |
| <i>M. truncatula</i> (Ahwaz) | A | ۱۰/۶۶ | D | ۱۸/۲۹ | G |
| <i>M. truncatula</i> (Gorgan) | C | ۷/۶۷ | C | ۱۹/۶۹ | B |

(۱) نسبت به وزن خشک

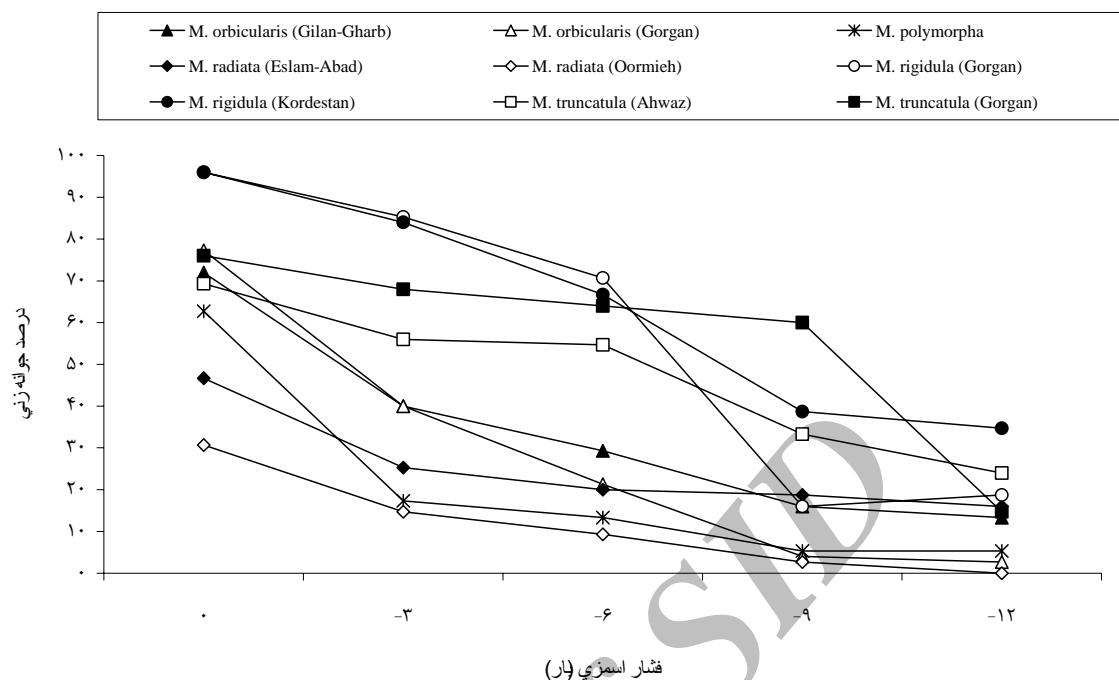
(۲) نسبت به وزن تر

جدول ۵: ضرایب همبستگی بین صفات مورد بررسی در ارزیابی مقاومت گونه‌های یونجه یکساله مورد مطالعه

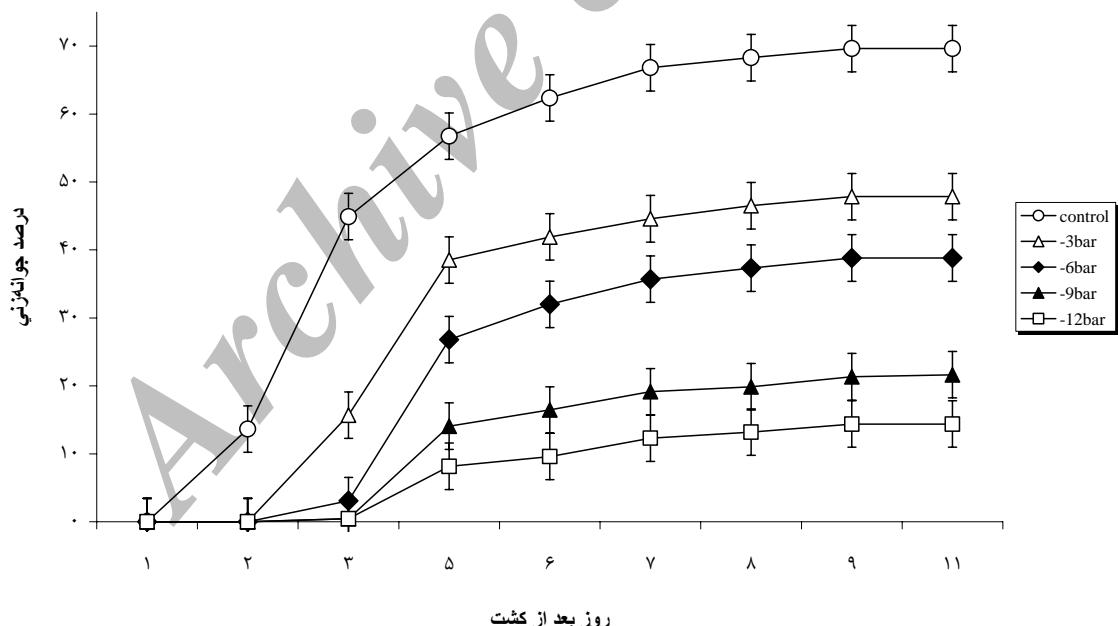
| قندهای محلول | پرولین آزاد | طول ریشه | ارتفاع ساقه | سلامت گیاه | سلامت گیاه ۲ | سلامت گیاه ۱ |
|--------------|-------------|----------|-------------|------------|--------------|--------------|
| -۰/۰۳ | -۰/۱۷ | -۰/۲۷ | -۰/۴۹ | ۰/۶۲ | ۰/۶۰ | ۱/۰۰ |
| -۰/۱۸ | -۰/۰۷ | ۰/۰۶ | -۰/۴۲ | ۱/۰۰ | ۱/۰۰ | ۱/۰۰ |
| -۰/۳۱ | -۰/۱۳ | ۰/۰۶ | ۱/۰۰ | ۱/۰۰ | ۱/۰۰ | ۱/۰۰ |
| -۰/۷۴ | -۰/۷۱ | -۰/۷۱ | ۱/۰۰ | ۱/۰۰ | ۱/۰۰ | ۱/۰۰ |
| ۰/۲۹ | ۰/۲۹ | ۰/۲۹ | ۰/۲۹ | ۰/۲۹ | ۰/۲۹ | ۰/۲۹ |
| ۱/۰۰ | ۱/۰۰ | ۱/۰۰ | ۱/۰۰ | ۱/۰۰ | ۱/۰۰ | ۱/۰۰ |



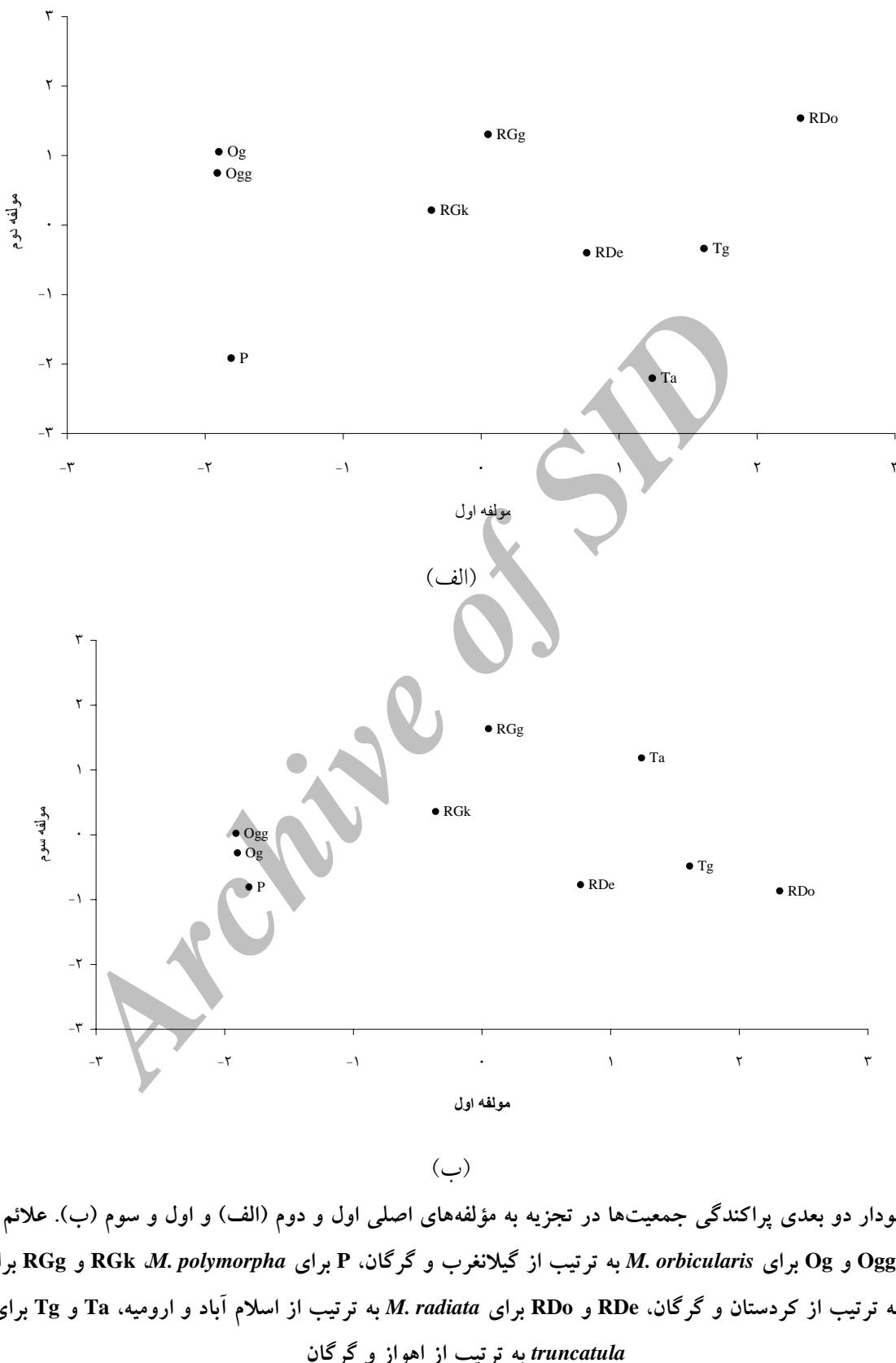
شکل ۱: میانگین درصد جوانهزنی بذر جمعیت‌های یونجه یکساله به تفکیک جمعیت طی ۱۱ روز بعد از کشت.
(خطهای عمودی معرف محدوده تفاوت معنی دار آزمون دانکن در سطح ۰/۵٪ است).



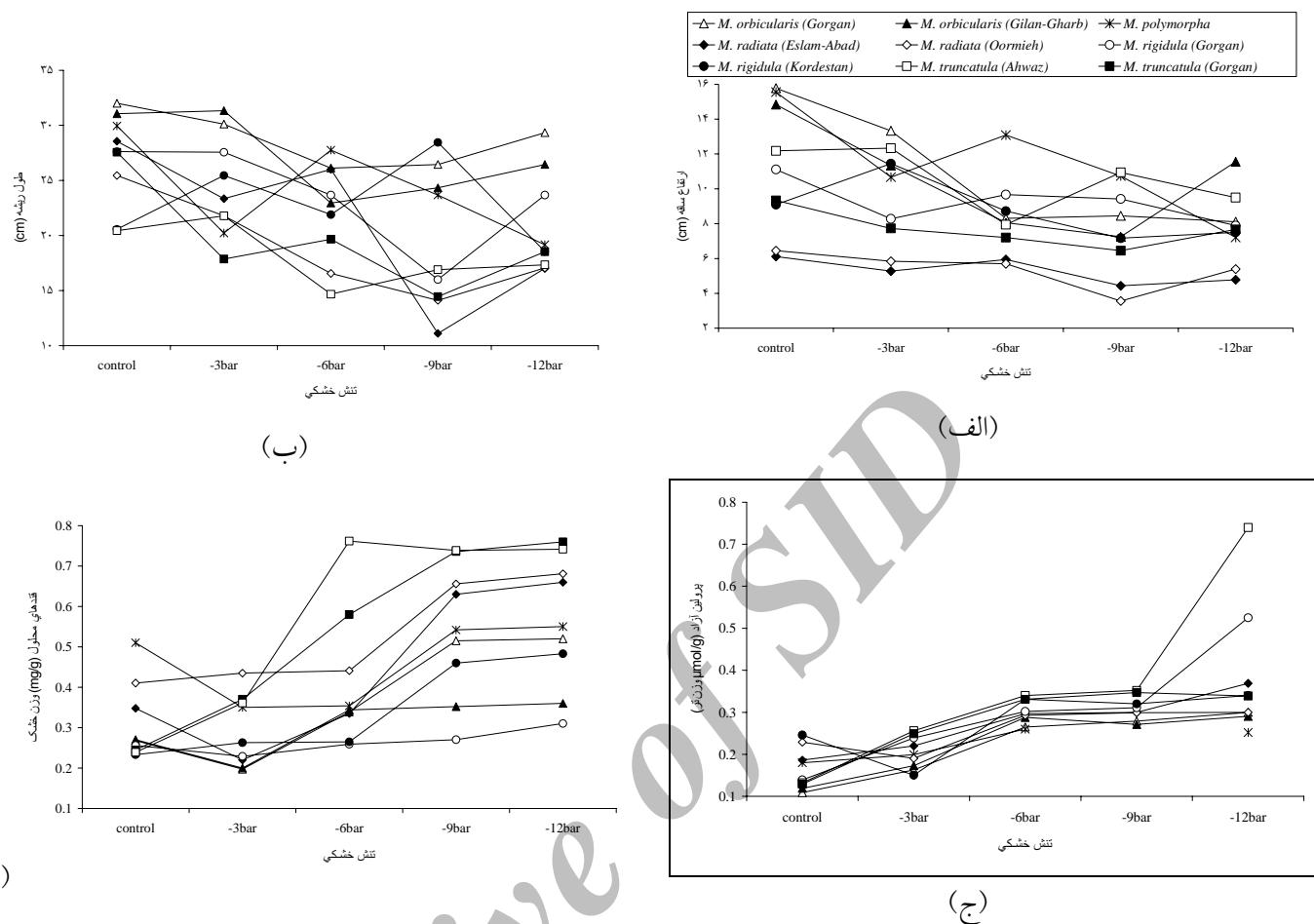
شکل ۲: درصد جوانهزنی بذر جمیعت‌های مختلف یونجه یکساله، ۱۱ روز بعد از کشت در سطوح مختلف تنش خشکی



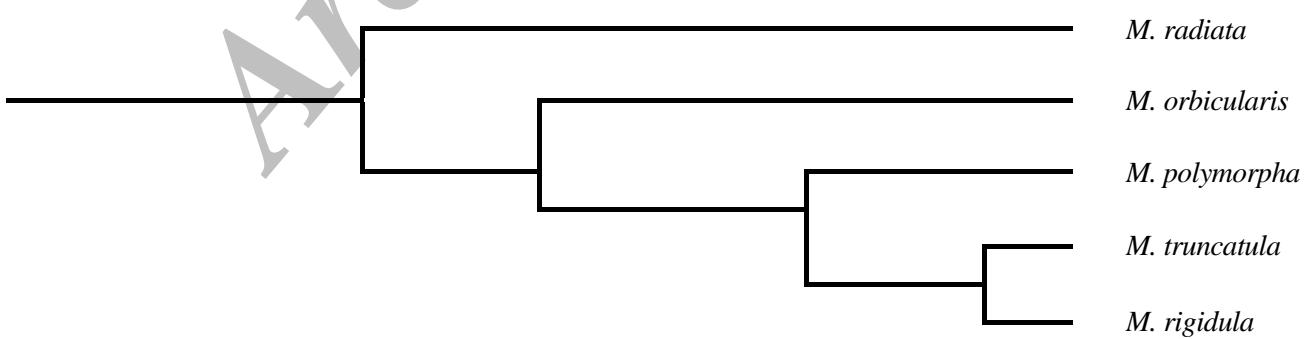
شکل ۳: میانگین درصد جوانهزنی بذر جمیعت‌های یونجه یکساله به تفکیک سطوح مختلف تنش خشکی طی ۱۱ روز بعد از کشت. (خطهای عمودی معرف محدوده تفاوت معنی‌دار آزمون دانکن در سطح ۰/۵٪ است).



شکل ۴: نمودار دو بعدی پراکندگی جمعیت‌ها در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی اول و دوم (الف) و اول و سوم (ب). علائم اختصاری عبارتند از: Og و Ogg برای *M. orbicularis* به ترتیب از گیلانغرب و گرگان، P برای *M. polymorpha* و RGg و RGk برای *M. radiata* به ترتیب از کردستان و گرگان، RDe و RDo برای *M. truncatula* به ترتیب از اسلام‌آباد و ارومیه، Ta و Tg برای *M. rigidula* به ترتیب از اهواز و گرگان



شکل ۵: تغییرات صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش تنش خشکی بر حسب میزان تنش به تفکیک جمعیت‌های یونجه یکساله مورد مطالعه. (الف) ارتفاع ساقه (ب) طول ریشه (ج) پرولین آزاد (د) قندهای محلول



شکل ۶: نمودار خوبی‌سازنده فیلوژنیک گونه‌های یونجه یکساله مورد مطالعه (برگرفته از Bena, ۲۰۰۱)

- یونجه یکساله بر اساس صفات مورفولوژیک . تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۷: ۸۱-۹۶.
- شریعت، آ.، میرزایی ندوشن، ح.، قمری زارع، ع. و سنگتراش، م.ح. ۱۳۸۰b. مطالعه الکتروفورز پروتئین های ذخیره ای در گونه هایی از یونجه یکساله. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۸: ۶۷-۸۰.
- عبادی خزینه قدیم، ع. ۱۳۷۸. بررسی جنبه های فیزیولوژیک افزایش عملکرد در یونجه های دیم. پایان نامه دکترای دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
- Aspinal, D. and Paleg, L.G., 1980. Proline accumulation: Physiological aspects. In: Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants (Eds D. Aspinal & L.G. Paleg), Academic Press, USA.
- Badaruddin, M. and Meyer, D. 1990. Green-manure legume effects on soil nitrogen, grain yield, and nitrogen nutrition of wheat. *Crop Science*, 30: 819-824.
- Bena, G. 2001. Molecular phylogeny supports the morphologically based taxonomic transfer of the *Medicagoid trigonella* species to the genus *Medicago* L. *Plant Systematics and Evolution*, 229: 217-236
- Bohnert, H., Nelson, D. and Jensen, R. 1995. Adaptations to Environmental Stresses. *The Plant Cell*, 7:1099-1111
- Brahim, K. and Smith, S. 1993. Annual medic establishment and the potential for stand persistence in southern Arizona. *Journal of Range Management*, 46:21-25
- Clifford, S., Arndt, S., Corlett, J., Joshi, S., Sankhla, N., Popp, M. and Jones, H. 1998. The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk). *Journal of Experimental Botany*, 49:967-977
- Culter, J.M., and Rains, D.W., 1978. Effects of water stress and hardening on the internal water relations and osmotic constituents of cotton leaves. *Physiologia Plantarum* 42:261-268
- Fisher, D. 1985. *In situ* measurement of plant water potentials by equilibration with microdroplets of polyethylene glycol 8000. *Plant Physiology*, 79:270-273
- Hoagland, D. and Arnon, D. 1950. The water-culture for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circulation*, 347.

منابع مورد استفاده

- اکبرزاده، م.، و سalarی، ا. ۱۳۶۸. بررسی میزان تولید علوفه یونجه های یکساله در شرایط دیم ارومیه. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور، شماره انتشار ۶۳-۶۹، تهران.
- باقری، م. ۱۳۸۰. اثر تراکم کاشت بر عملکرد بذر ۵ رقم یونجه یکساله پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
- پهلوان پور فرد جهرمی، ع. ۱۳۷۶. اثرات فیزیولوژیکی شرایط کم آبی بر یونجه های یکساله. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه شیراز، شیراز.
- حیدری شریف آباد، ح. ۱۳۶۷. تأثیر یونجه های یکساله در افزایش عملکرد گندم در منطقه طالقان. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران، کرج، ایران.
- حیدری شریف آباد، ح. و ایران منش، ع. ۱۳۷۵. تأثیر سوش ریزو بیوم بر روی رشد و ثبیت نیتروزون ارقام یونجه دیم ۷۵-۸۵: ۳۰.
- خلیلی، ق. ۱۳۷۰. اثر مقادیر مختلف میزان بذر و کود ازته بر عملکرد و برخی خصوصیات کمی و کیفی یونجه یکساله کولتیوار Snai. پایان نامه کارشناسی ارشد زراعت، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
- دشتی، م. ۱۳۷۵. تأثیر سوش های مختلف ریزو بیوم ملیوتی (*Rhizobium meliloti*) بر ثبیت ازت و خصوصیات رشد در سه گونه یونجه یکساله. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.
- سنگل، ع. و ملک پور، ب. ۱۳۷۳. مروری بر تحقیقات انجام شده و در حال اجرا در رابطه با یونجه های یکساله در ایران و تدوین برنامه کار برای آینده. مؤسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور، شماره انتشار ۱۰۳-۱۳۷۳، تهران.
- میرزایی ندوشن، ح. ۱۳۷۹. تولید مثل و تلاقیهای بین گونه های در یونجه های یکساله. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۳: ۳۳-۶۲.
- شریعت، آ.، میرزایی ندوشن، ح.، قمری زارع، ع. و سنگتراش، م.ح. ۱۳۸۰a. بررسی قربت درون و بین گونه های

- northern Utah pastures. *Journal of Range Management*, 39:52-58
- Sheidai, M., Arman, M. and Zehzad, B. 2002. Chromosome pairing and B-chromosomes in some *Aegilops*(Poaceae) species and populations from Iran. *Caryologia* 55:271-361
- Specht, J., Chase, K., Macrander, M., Graef, G., Chung, J., Markwell, J., Germann, M., Orf, J. and Lark, K. 2001. Soybean response to water: A QTL analysis of drought tolerance. *Crop Science*, 41:493-502
- Thomas, H., 1997. Drought resistance in plants. In: Mechanisms of environmental stress resistance in plants (Ed A Basra) CRC Publishers
- Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H. 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168:223-231
- Vajrabhaya, M., Kumpun, W. and Chadchawan, S. 2001. The solute accumulation: the mechanism for drought tolerance in RD23 rice (*Oryza sativa* L.) lines. *ScienceAsia*, 27:93-97
- Zhu, J., Kang, H., Tan, H. and Xu, M. 2006. Effects of drought stresses induced by polyethylene glycol on germination of *Pinus sylvestris* var. mongolica seeds from natural and plantation forests on sandy land. *Journal of Forest Research*, 11: 319-328
- Irigoyen, J. J., Emerich, D. W. and Sanchez-Diaz, M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, 84:55-60
- Lyons, E., Pote, J., Dacosta, M. and Huang, B. 2007. Whole-plant carbon relations and root respiration associated with root tolerance to high soil temperature for *Agrostis* grasses. *Environmental and Experimental Botany*, 59:307-313
- Malcolm, P., Holford, P., Mcglasson, W. and Conroy, J. 2004. Root zone temperature influences the growth, dry mass partitioning and leaf morphology of actively growing and bud-break plants of the peach rootstock, green leaf nemaguard. VIII International Symposium on Canopy, Rootstocks and Environmental Physiology in Orchard Systems 732: 533-541
- Noland, T., Mohammed, G. and Scott, M. 1997. The dependence of root growth potential on light level, photosynthetic rate, and root starch content in jack pine seedlings. *New Forests*, 13:105-119
- Ottow, E., Brinker, M., Teichmann, T., Fritz, E., Kaiser, W., Brosche, M., Kangasjarvi, J., Jiang, X. and Polle, A. 2005. *Populus euphratica* displays apoplastic sodium accumulation, osmotic adjustment by decreases in calcium and soluble carbohydrates, and develops leaf succulence under salt stress. *Plant Physiology* 139:1762-1772
- Rodriguez, G., Cantusilva, I., Meza, G. and Lozano, R. 2004. Plant water relations of thornscrub shrub species, north-eastern Mexico. *Journal of Arid Environments*, 58:483-503
- Rumbaugh, M. and Johnson, D. 1986. Annual medics and related species as reseeding legumes for

Assessment of resistance to PEG-induced drought in annual medic using aquaculture conditions

A. Ghamari-Zare^{1*}, S. Rezvani² and M. Forootan³

1* - Corresponding author, Assis. Prof., Institute of Forests and Rangelands, P.O.Box 13185-116, Tehran, I.R.Iran.

E-Mail : ghamari-zare@fir-oic.ir

2 - MSc., Jiroft Branch, Islamic Azad University, Kerman, I.R.Iran

3 - PhD., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran

Received: 17.04.2008

Accepted: 14.09.2008

Abstract

Annual medics (*Medicago spp.*) are suitable plant species for cultivation in regions with soil erosion problem, and due to limited water resources in such areas, drought resistance in these species is considered a valuable trait. Nine populations, of five annual medic species were assessed for drought resistance under aquaculture condition. Different levels of polyethylene glycol (PEG) were employed to induce drought stress Physiological/biochemical traits including germination rate, leaf vigor, root length, shoot height, free proline content, and total soluble sugars were recorded. Results confirmed the significant effects of PEG on drought stress induction, and biochemical traits showed higher correlation with drought level compared to phenotypical ones. It is postulated that while sugar accumulation is started at low stages of drought, proline accumulation will initiate at critical drought levels. While *M. truncatula* expressed higher levels of biochemical traits, *M. orbicularis* showed superior in terms of phenotypic characteristics. The results suggested that the drought resistance gained by proline accumulation capability might have emerged in annual medic during the long-term biodiversity procedure.

Keywords: Annual medics, Aquaculture, Drought stress, Polyethylene glycol